

基于 Hippo/YAP 通路探讨补肾强督治痿汤对强直性脊柱炎异位骨化的改善作用

陈柏臻^{1,2}, 曾睿^{1,2}, 周海燕^{1,2}, 杨璐^{1,2}, 陈美琪^{1,2,3}, 周颖燕^{1,2}, 马梦洋⁴,
何羿婷^{1,2,3*}, 何晓红^{1,2*}

[1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510000; 2. 广州中医药大学第二附属医院 (广东省中医院), 广东 广州 510000; 3. 广东省中医证候临床研究重点实验室, 广东 广州 510000; 4. 河南省洛阳正骨医院 (河南省骨科医院), 河南 郑州 450000]

摘要: **目的** 探究补肾强督治痿汤对强直性脊柱炎 (AS) 异位骨化的影响。**方法** 体内实验: 将 BALB/c 小鼠随机分为空白组、模型组、塞来昔布组 (70 mg/kg) 及补肾强督治痿汤低、中、高剂量组 (18.5、37、74 g/kg), 采用胶原抗体诱导法构建 AS 异位骨化小鼠模型, 造模第 10 天灌胃给药至第 42 天。记录小鼠一般情况及足踝关节肿胀情况, micro-CT、HE 染色、番红固绿染色评估关节异位骨化情况, 转录组测序筛选核心信号通路。体外实验: 以髌关节韧带成纤维细胞为研究对象构建韧带成纤维细胞成骨分化模型, 分别给予低、中、高剂量补肾强督治痿汤 (0.25、0.5、1 mg/mL), CCK-8 法检测细胞活性, ALP 染色和茜素红染色评估成骨分化水平, Western blot 法检测成骨标志物 RUNX2、Col1a1、OPN 蛋白表达及 Hippo/YAP 通路相关蛋白 LATS、YAP 表达及磷酸化水平, 免疫荧光法检测 Hippo/YAP 蛋白核定位情况与表达。**结果** 体内实验: 与模型组比较, 补肾强督治痿汤各剂量组及塞来昔布组未产生体质量及肝脏、脾脏、肾脏脏器指数变化 ($P>0.05$), 补肾强督治痿汤中剂量组小鼠关节肿胀度降低 ($P<0.05$), 各剂量组异位骨化程度减轻, 新骨组织体积减少 ($P<0.01$)。转录组学分析提示 Hippo/YAP 通路是补肾强督治痿汤发挥作用的核心通路之一。体外实验: 与模型组比较, 补肾强督治痿汤各剂量组 ALP 染色阳染面积减少 ($P<0.01$), 茜素红染色阳染面积减少 ($P<0.05$, $P<0.01$), 成骨相关标志物蛋白 Col1a1、SOX9、RUNX2、OPN 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 成骨相关标志物 *ALP*、*Col1a1*、*RUNX2* mRNA 表达降低 ($P<0.05$), Hippo/YAP 通路相关蛋白磷酸化水平 (p-LATS/LATS、p-YAP/YAP) 升高 ($P<0.05$), YAP 总蛋白表达及核内荧光强度降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 补肾强督治痿汤可能通过激活 Hippo/YAP 通路, 抑制韧带成纤维细胞 YAP 核转位及下游成骨基因转录, 从而减轻 AS 异位骨化。

关键词: 补肾强督治痿汤; 强直性脊柱炎; 病理性新骨形成; 转录组学; Hippo/YAP 通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2026)08-2587-13

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.08.012

Improvement effect of Bushen Qiangdu Zhilou Decoction on heterotopic ossification in ankylosing spondylitis based on the Hippo/YAP pathway

CHEN Bo-zhen^{1,2}, ZENG Rui^{1,2}, ZHOU Hai-yan^{1,2}, YANG Lu^{1,2}, CHEN Mei-qi^{1,2,3},
ZHOU Ying-yan^{1,2}, MA Meng-yang⁴, HE Yi-ting^{1,2,3*}, HE Xiao-hong^{1,2*}

[1. The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine), Guangzhou 510000, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndromes, Guangzhou 510000, China; 4. Luoyang Orthopedic Hospital of Henan Province (Henan Provincial Orthopedic Hospital), Zhengzhou 450000, China]

收稿日期: 2026-02-02

基金项目: 国家自然科学基金 (82174285); 广东省名中医传承工作室建设项目 (0102018004); 广州市科技局市院联合资助项目 (2024A03J0718); 广东省中医院院内专项 (YN2024GZRPY086); 广东省中医院临床研究专项 (YN10101905)

作者简介: 陈柏臻 (1997—), 男, 硕士, 从事中医药防治风湿免疫病的研究。E-mail: 596029666@qq.com

*** 通信作者:** 何晓红 (1977—), 女, 博士, 主任医师, 从事中医药防治风湿免疫病的研究。E-mail: hexh@2772.gzucm.edu.cn

何羿婷 (1963—), 女, 博士, 主任医师, 从事中医药防治风湿免疫病的研究。E-mail: wdtsxh521@126.com

ABSTRACT: AIM To investigate the effect of Bushen Qiangdu Zhilou Decoction on heterotopic ossification in ankylosing spondylitis (AS). **METHODS** *In vivo* experiment: BALB/c mice were randomly divided into a blank group, a model group, a celecoxib group (70 mg/kg), and low-, medium-, and high-dose Bushen Qiangdu Zhilou Decoction groups (18.5, 37 and 74 g/kg). The AS heterotopic ossification mouse model was established using the collagen antibody-induced method. From day 10 to day 42 after modeling, the mice were administered by gavage. The general condition and ankle joint swelling of the mice were recorded. Micro-CT, HE staining, and safranin O-fast green staining were used to evaluate joint heterotopic ossification. Transcriptome sequencing was performed to screen for core signaling pathways. *In vitro* experiment: Hip joint ligament fibroblasts were used to construct an osteogenic differentiation model of ligament fibroblasts. Low-, medium-, and high-dose Bushen Qiangdu Zhilou Decoction (0.25, 0.5 and 1 mg/mL) were administered, respectively. Cell viability was detected by CCK-8 assay. ALP staining and alizarin red staining were used to evaluate the level of osteogenic differentiation. Western blot was used to detect the protein expressions of osteogenic markers RUNX2, Col1a1, and OPN, as well as the expressions and phosphorylation levels of Hippo/YAP pathway-related proteins LATS and YAP. Immunofluorescence was used to detect the nuclear localization and expressions of Hippo/YAP proteins. **RESULTS** *In vivo* experiment: Compared with the model group, there were no significant changes in body weight and organ indices of the liver, spleen, and kidney in the Bushen Qiangdu Zhilou Decoction groups of various doses and the celecoxib group ($P>0.05$). The joint swelling degree was reduced in the medium-dose Bushen Qiangdu Zhilou Decoction group ($P<0.05$). The degree of heterotopic ossification was alleviated, and the volume of new bone tissue was decreased in all dose groups ($P<0.01$). Transcriptomic analysis indicated that the Hippo/YAP pathway was one of the core pathways through which Bushen Qiangdu Zhilou Decoction exerts its effects. *In vitro* experiment: Compared with the model group, the positive staining areas of ALP were significantly reduced in all dose groups of Bushen Qiangdu Zhilou Decoction ($P<0.01$). The positive staining areas of alizarin red were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The protein expressions of osteogenesis-related markers Col1a1, SOX9, RUNX2, and OPN were down-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$), and the mRNA expressions of *ALP*, *Col1a1*, and *RUNX2* were decreased ($P<0.05$). The phosphorylation levels of Hippo/YAP pathway-related proteins (p-LATS/LATS, p-YAP/YAP) were increased ($P<0.05$). The total protein expression and nuclear fluorescence intensity of YAP were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** Bushen Qiangdu Zhilou Decoction may alleviate AS heterotopic ossification by activating the Hippo/YAP pathway, inhibiting the nuclear translocation of YAP in ligament fibroblasts, and suppressing the transcription of downstream osteogenic genes.

KEY WORDS: Bushen Qiangdu Zhilou Decoction; ankylosing spondylitis; pathological new bone formation; transcriptomics; Hippo/YAP pathway

强直性脊柱炎（ankylosing spondylitis, AS）是一种以中轴关节慢性炎症和脊柱关节韧带异位骨化为特征的自身免疫性疾病，其典型病理表现为骶髋关节和脊柱的炎症反应及韧带附着点的病理性新骨形成，最终导致脊柱强直和功能丧失，好发于青壮年^[1]。现代医学对 AS 的治疗主要依赖非甾体抗炎药和生物制剂，这些药物虽可缓解炎症症状，但对异位骨化的抑制作用有限，且长期使用易引发感染、心血管事件等不良反应^[2]。有研究表明，约半数 AS 患者的炎症标志物处于正常水平时仍存在影像学进展^[3]，提示新骨形成可能与炎症非直接相关，亟需探索独立于炎症调控的治疗策略^[4-6]。

中医理论将 AS 归为“肾痹”“骨痹”范畴，认为肾虚督寒、外邪侵络是其核心病机^[7-8]。全国名老中医焦树德教授考据经典，认为 AS 与内经所载“大偻”高度相符，并据此创制补肾强督治偻汤，在临床上广泛应用，取得满意疗效。补肾强督治偻汤在临床研究中显示出降低患者疾病活动度，改善骨质破坏并调节成骨相关分子表达的作用^[9]。动物实验亦表明，补肾强督治偻汤能抑制胶原抗体诱导性关节炎（collagen antibody-induced arthritis, CAIA）小鼠的异位骨化进展，但其具体机制尚未明确^[10]。

近期研究表明，Hippo/YAP 信号通路在骨代

谢调控中起关键作用^[11]，能够影响成骨分化与骨稳态^[12]。研究发现，AS 患者的骨化韧带组织中 Hippo 通路相关基因异常高表达，提示 YAP 可能通过激活成骨转录因子促进异位骨化^[13]。本研究以补肾强督治痿汤为研究对象，聚焦 Hippo/YAP 通路，通过动物实验、转录组学分析及体外细胞验证，探索其对 AS 异位骨化的影响及分子机制，为中医药治疗 AS 提供科学依据和新的思路。

1 材料

1.1 实验动物 6~8 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 36 只，体质量（20±2）g，由广州中医药大学实验动物中心管理 [实验动物生产许可证号 SCXK（粤）2023-0068，实验动物使用许可证号 SYXK（粤）2023-0342]，饲养环境温度 23~25℃，相对湿度 50%~60%，给予充足食物及饮水，12 h/12 h 光照/黑暗循环。实验方案经广州中医药大学动物研究伦理委员会审定并全程监督（伦理审查号 20241014004）。

1.2 药物 每剂补肾强督治痿汤由骨碎补 18 g、狗脊 30 g、杜仲 20 g、制附子 12 g、白术 10 g（康美药业股份有限公司，批号 2403301061、231202281、240400071、240102006、240300149）；补骨脂 12 g、熟地黄 15 g、淫羊藿 12 g、羌活 12 g、鹿角霜 6 g、川牛膝 12 g、土鳖虫 9 g、炙麻黄 6 g、威灵仙 15 g、生薏苡仁 30 g、赤芍 12 g、白芍 12 g（岭南药业集团有限公司，批号 240301、240101、240301、2306001、2401001、2402001、240101、2401001、2401001、2401003、2402001、2401002）；独活 10 g、川断 18 g、防风 12 g（中国中药有限公司，批号 C12312152、C12311050、C12311168）；泽兰 15 g、干姜 6 g（大翔医药集团有限公司，批号 HX24R02、HX24K01）；桂枝 15 g、知母 15 g（广州采芝林药业有限公司，批号 YPB4C0001、YPB4B0001）、白僵蚕 12 g（广州至信药业股份有限公司，批号 2402001）组成，中药饮片购自广东省中医院，经广东省中医院药学部鉴定符合 2020 年版《中国药典》要求。塞来昔布胶囊（规格 0.2 g/粒，美国辉瑞公司，批号 0145631）。

1.3 试剂 Arthrogen-CIA[®] 5-Clone Cocktail Kit、Biotinylated Lipopolysaccharide from *E. coli* O111（美国 Chondrex 公司，货号 53100、9028）；HE 染液（北京兰杰柯科技有限公司，货号 BL735B）；骨组织番红固绿染液（东莞爱必胜生物科技有限公司，货号 ABC1071）；TRIzol、oligo（dT）磁珠、dUTP

Solution、LATS 一抗、p-LATS 一抗（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，货号 15596026CN、25-61005、R0133、PA5-95564、PA5-105444）；HiScript III RT SuperMix for qPCR（+gDNA wiper）、ChamQ SYBR qPCR Master Mix（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，货号 R323-01、Q341-02）；NEBNext Ultra RNA LibraryPrepKit for Illumina（英国 New England Biolabs 公司，货号 E7530L）；EZ-press RNA 纯化试剂盒（美国 ZScience Biotechnology 公司，货号 EZB-RN001-plus）；SOX9、OPN、RUNX2、Col1a1、GAPDH、YAP、p-YAP 一抗、兔二抗、鼠二抗（美国 Cell Signaling Technology 公司，货号 82630、88742、12556、72026、2118、14074、13008、7074、7076）。

1.4 仪器 酶联免疫检测仪（美国 BioTek 公司）；生物分析仪（型号 Bioanalyzer 2100，美国 Agilent 公司）；高分辨率台式 micro-CT 系统（型号 Skyscan 1276，德国 Bruker 公司）；基因测序仪（型号 NovaSeq 6000，美国因美纳公司）；电子压片成像仪 [型号 e-BLOT，易亨特生命科学（上海）有限公司]；超微量分光光度计（型号 NanoDrop 2000C，美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；实时荧光定量 PCR 系统（型号 ABI7500，美国 ABI 公司）；倒置荧光显微分析系统（型号 ECLIPSE Ti2，日本尼康公司）。

2 方法

2.1 中药溶液及塞来昔布溶液制备 中药溶液：制附子于 400 mL 纯水中先煎 1 h，加入其余药及纯水 3 L，煮沸 1.5 h，稍冷却后过滤，取水煎液，将 2 L 纯水加至剩余饮片中，武火煮沸后转文火煎 1 h，稍冷却后过滤，取水煎液，将 2 次所得水煎液混合，旋转蒸发，浓缩至生药 6.4 g/mL，于 4℃ 冰箱中保存备用，取少量中药原液制成冻干粉，使用无血清 DMEM 充分溶解为 50 mg/mL 中药原液，过滤除菌分装后于 -20℃ 冰箱中保存备用，体外实验时，使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基配制所需浓度。塞来昔布溶液：塞来昔布胶囊每粒拆取内容物并溶解于 2 mL 无水乙醇中，超声混匀后加入 48 mL 超纯水，于 4℃ 冰箱中保存备用。

2.2 分组、给药及造模 36 只 BALB/c 小鼠随机分为空白组、模型组、塞来昔布组（根据体表面积折算临床等效剂量为 70 mg/kg）和补肾强督治痿汤低、中、高剂量组（根据体表面积折算剂量为 18.5、37、74 g/kg）。除空白组外，其余各组小鼠均使用胶原抗体诱导法构建 AS 异位骨化模型进

行研究^[13-14]，在造模第 0 天按 1.5 mg/只腹腔注射 5-Clone Cocktail 胶原抗体混合悬液，第 3 天腹腔注射 50 mg LPS 诱导免疫炎症，构建 AS 异位骨化模型。模型构建评判采用计分形式，轻度踝关节、腕关节发红、肿胀，计 1 分；踝关节或腕关节中度发红肿胀，计 2 分；关节严重发红、肿胀，出现末端关节肿胀，计 3 分；多关节最大程度发炎，关节僵硬出现跛行，计 4 分。四肢总分达到 6 分及以上视为动物模型造模成功。从造模第 10 天开始，各给药组灌胃给予相应剂量药物，空白组和模型组灌胃给予生理盐水，第 42 天停止给药并取材。

2.3 关节肿胀度测量 造模开始前，在小鼠跖跗关节平面作定位标记，每 3 d 测量 1 次小鼠足垫直径及体质量，计算小鼠关节肿胀度。公式为关节肿胀度=[（跖跗关节面足垫直径-第 0 天跖跗关节面足垫直径）/第 0 天跖跗关节面足垫直径]×100%。

2.4 取材及组织处理 42 d 给药干预后，小鼠禁食不禁水 12 h，称定体质量，异氟烷麻醉小鼠并安乐死，使用精密电子天平称量肝、脾、肾脏湿重并计算脏器指数，取双后肢完整骨骼组织，分别使用 RNA 稳定液冻存或使用组织固定液固定备用。

2.5 micro-CT 扫描足踝观察异位成骨情况 使用 micro-CT 对固定的小鼠足踝组织进行扫描，扫描电压 55 kV，电流 200 μA，扫描持续时间为 7 min 20 s，完成扫描后使用 CT Vox v1.15.4.0 软件进行剖面分析，使用 NRecon v1.6.10.4 软件进行三维重建，使用 CTan v1.15.4.0 软件选取框定小鼠跖骨、跖骨区域，测算小鼠异位新骨体积。

2.6 足踝骨组织脱钙及病理组织染色 小鼠足踝骨组织脱钙及苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色、番红固绿染色方法参照课题组前期研究^[10]。

2.7 足踝组织 mRNA 提取、纯化与建库测序 采用 TRIzol 试剂，根据厂商提供的操作方案对总样品的 RNA 进行分离和纯化，使用 NanoDrop 对总 RNA 量与纯度进行质控，并使用 Bioanalyzer 2100 对 RNA 完整性进行检测。RNA 质量浓度>50 ng/μL，RIN 值>7.0，OD_{260/280}>1.8，total RNA>1 μg 进行下游实验。使用 oligo（dT）磁珠，根据厂商操作方案进行 2 轮纯化，特异性捕获 mRNA，根据仪器厂商配套试剂及操作方案，使用 RNA 库制备试剂盒生成测序文库，并进行 Illumina 高通量测序，产生 150 bp 配对末端读数。

2.8 足踝组织 mRNA 测序下机数据处理与数据分

析 采用 fastq 文件格式控制 RNA-seq 数据的读取质量。采用 Bowtie2 v2.3.3 和 Tophat2 v2.1.1 工具将 RNA-seq 的 reads 数据结果配对到小鼠基因组上，找出外显子之间的结合位点，并使用其下游软件 Cufflinks 计算基因表达（FPKM），鉴别不同样本间的差异基因，随后使用 DESeq2 R v1.16.1 软件进行差异表达分析，使用 Benjamini 和 Hochberg 法对 *P* 值进行调整，基于差异分析结果，筛选 *P*<0.05 且 |log₂FC|>2 的基因为显著差异基因，并基于组间差异表达基因的筛选结果实施基因功能注释及通路富集分析。通过 GO 数据库（<http://www.geneontology.org/>）对 DEGs 进行系统注释，并使用显著性富集分析以揭示其核心生物学特征，利用 KEGG 数据库（<https://www.kegg.jp>）开展通路富集分析。

2.9 细胞培养 大鼠髌关节韧带成纤维细胞（Hip-ligament fibroblasts，Hlfcs）于团队前期研究获得并鉴定、冻存。复苏后使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基，于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。待细胞稳定生长，融合度达到 70%~80% 时，用 0.25% 胰酶消化、传代，接种于培养瓶或培养板。

2.10 CCK-8 法检测细胞活力 将细胞以每孔 1×10⁴ 个的密度接种至 96 孔板。待细胞完全贴壁后，使用无血清 DMEM 饥饿细胞 8 h，分别加入 0、62.5、125、250、500、1 000、2 000、4 000、8 000 μg/mL 补肾强督治痿汤处理 72 h，无血清 DMEM 润洗 2 次后，每孔加入 90 μL 无血清 DMEM 及 10 μL CCK-8 检测液，于 37℃ 恒温孵育箱中孵育 0.5 h，使用酶标仪在 450 nm 波长处检测光密度（OD）值并计算细胞活性。公式为细胞活性=[（OD_{给药组}-OD_{空白组}）/（OD_{对照组}-OD_{空白组}）]×100%。

2.11 Hlfcs 成骨诱导、分组及给药 选取处于对数生长期的 Hlfcs，按照每孔 1×10⁵ 个的密度接种于 6 孔板中。待细胞汇合度达到 60% 时进行分组给药。空白组给予完全培养基；模型组给予完全培养基+成骨诱导；补肾强督治痿汤低、中、高剂量组给予完全培养基+成骨诱导+0.25、0.5、1 mg/mL 补肾强督治痿汤（经 0.22 μm 筛网过滤除菌）。成纤维细胞成骨诱导培养基配方为 10 mmol/L β-甘油磷酸钠+50 μmol/L *L*-抗坏血酸+100 nmol/L 地塞米松+7 ng/mL BMP-2+5 ng/mL TGF-β1^[15-17]，现用现配，每 3 d 更换 1 次新鲜培养基，细胞汇合度达到 90% 以上后采取半量换液。

2.12 ALP 染色及茜素红染色检测细胞成骨分化情况 成骨诱导分化 7 d 后,使用多聚甲醛固定液固定细胞,加入根据试剂盒说明书配制的 ALP 染色工作液,室温避光孵育 2 h,轻柔润洗后于显微镜下观察并拍照,应用 Image J 软件对 ALP 染色图像进行染色面积定量分析。成骨诱导分化 14 d 后,使用多聚甲醛固定液固定细胞,加入茜素红 S 染液,室温孵育 10 min, PBS 轻柔润洗后于显微镜下观察并拍照,应用 Image J 软件对图像进行染色面积定量分析。

2.13 Western blot 法检测 Hlfcs 成骨相关蛋白 (SOX9、OPN、RUNX2、Col1a1) 表达及 Hippo/YAP 通路相关蛋白 (LATS、YAP) 磷酸化情况 成骨诱导分化 7 d 后,使用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 冰上裂解细胞 5 min,刮取细胞裂解产物并定量,加入上样缓冲液,95 ℃ 加热 5 min 使蛋白变性,于-20 ℃ 条件下冷冻保存。SDS-PAGE 电泳并转膜后使用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,分别加入 SOX9、OPN、RUNX2、Col1a1、LATS、p-LATS、YAP、p-YAP (1 : 1 000)、GAPDH (1 : 2 000) 一抗,4 ℃ 孵育过夜。次日使用 TBST 漂洗,加入对应二抗 (1 : 2 000) 孵育 1 h,再次漂洗,使用 ECL 发光显影,并使用接触式化学发光成像仪进行成像,通过 Image J 软件分析条带 OD 值,以 GAPDH 为内参,计算蛋白相对表达量。

2.14 RT-qPCR 法检测 Hlfcs 成骨相关基因 (ALP、RUNX2、Col1a1) mRNA 表达 成骨诱导分化 7 d 后,使用 EZ-press RNA 纯化试剂盒以离心柱法提取细胞总 RNA,使用 NanoDrop 紫外分光光度计对 RNA 进行浓度检测,并使用 A_{260}/A_{280} 比值进行 RNA 样本质量控制。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成,序列见表 1。以 GAPDH 为内参,使用逆转录试剂盒配制逆转录体系,并根据说明书体系条件逆转录为 cDNA,随后使用 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix 试剂套装,根据推荐配制稀释引物并配制反应体系后上机进行 qRT-PCR 检测,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 相对表达量。

2.15 免疫荧光检测 6 孔板中加入多聚赖氨酸包被的细胞爬片,按照每孔 1×10^5 个的密度接种于 6 孔板中,24 h 后成骨诱导并给药干预,在 Hippo/YAP 通路磷酸化高峰期时 (成骨诱导干预 6 h 后) 使用多聚甲醛固定液固定细胞,取出爬片滴加山羊血清封闭,使用 1 : 100 稀释的 YAP 一抗,于湿盒

中孵育过夜, PBST 润洗后滴加荧光二抗避光孵育 1 h, PBST 润洗后使用含 DAPI 的抗淬灭封片剂封片,并使用荧光显微镜拍照。应用 Image J 软件对图像进行荧光强度定量分析,计算各组荧光强度。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences	
基因	引物序列 (5'→3')
GAPDH	正向 AACTTTGGCATTGTGGAAGG
	反向 ACACATTGGGGGTAGGAACA
COL1a1	正向 CACTGCAAGAACACGCTAGC
	反向 AAGTTCGGTGTGACTCGTG
ALP	正向 AGATGGATGAGCCCATCGGA
	反向 CCAAACGTGAAAACGTGGGA
OPN	正向 CAGTCGATGTCCCTGACGG
	反向 GTTGCTGTCCTGATCAGAGG

2.16 统计学分析 采用 SPSS 27.0 软件进行处理,符合正态分布的数据以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,并使用双尾配对 t 检验分析,多组间比较采用单因素方差分析,若满足方差齐性则使用 Bonferroni 法,方差不齐使用 Tamhane's T2 法;不符合正态分布者,组间比较采用非参数分析,用中位数 M (下四分位数 P_{25} , 上四分位数 P_{75}) 表示。重复测量数据,不符合正态分布及方差齐性者采用重复测量-广义线性模型估计方程,同一时间,2 组间比较采用曼-惠特尼 U 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计意义。

3 结果

3.1 补肾强督治痿汤对 AS 异位骨化小鼠体质量及脏器指数的影响 与空白组比较,模型组、补肾强督治痿汤各剂量组及塞来昔布组小鼠体质量变化曲线未出现差异 ($P>0.05$), 见图 1。与模型组比较,各给药组小鼠肝、脾、肾脏指数均无明显变化 ($P>0.05$), 见表 2。

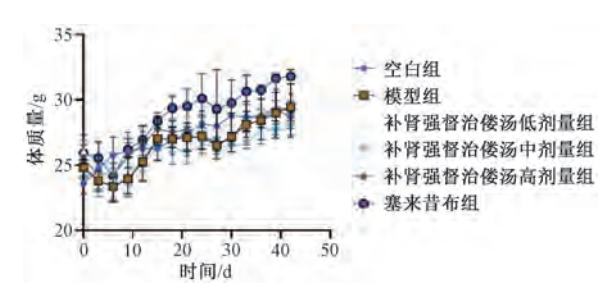


图 1 各组小鼠体质量变化 [$M(P_{25}, P_{75})$]

Fig. 1 Changes in body weight of mice in each group [$M(P_{25}, P_{75})$]

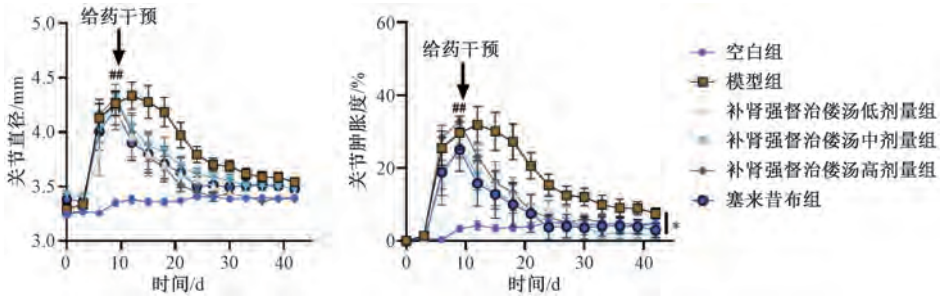
3.2 补肾强督治痿汤对 AS 异位骨化小鼠关节肿胀度的影响 如图 2 所示,造模第 9 天时,关节肿

表 2 各组小鼠肝脏、肾脏、脾脏指数比较 (mg/g, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab. 2 Comparison of liver, kidney and spleen indices of mice in each group (mg/g, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	肝脏指数($\times 10^{-2}$)	肾脏指数($\times 10^{-3}$)	脾脏指数($\times 10^{-3}$)
空白组	4.71 $\pm$ 0.28	8.09 $\pm$ 0.43	3.27 $\pm$ 0.51
模型组	5.20 $\pm$ 0.53 [#]	8.80 $\pm$ 0.82 [#]	3.42 $\pm$ 0.58
补肾强督治痿汤低剂量组	4.94 $\pm$ 0.23	9.22 $\pm$ 0.25	3.68 $\pm$ 0.17
补肾强督治痿汤中剂量组	5.05 $\pm$ 0.35	9.52 $\pm$ 0.35	3.53 $\pm$ 0.54
补肾强督治痿汤高剂量组	4.96 $\pm$ 0.69	9.14 $\pm$ 1.42	3.61 $\pm$ 0.29
塞来昔布组	5.66 $\pm$ 0.28	8.80 $\pm$ 0.71	3.21 $\pm$ 0.42

注：与空白组比较，[#] $P<0.05$ 。



注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ 。
图 2 各组小鼠关节直径及肿胀程度比较 [$M(P_{25}, P_{75})$, $n=6$]

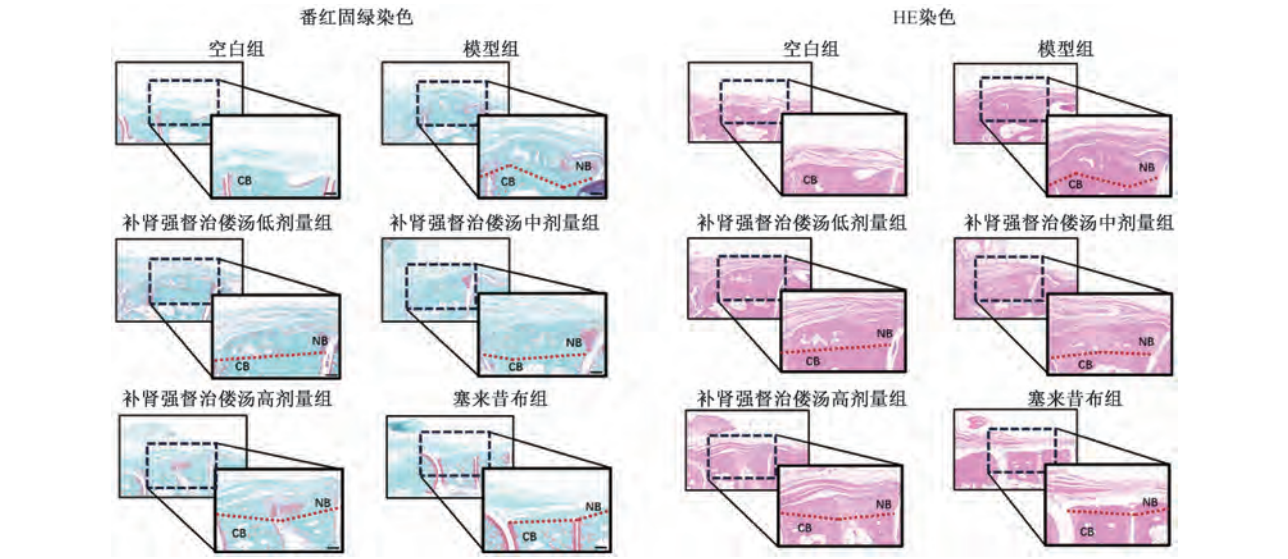
Fig. 2 Comparison of joint diameter and swelling degree of mice in each group [$M(P_{25}, P_{75})$, $n=6$]

胀水平达到巅峰。与正常组比较，模型组小鼠关节直径增加 ($P<0.01$)，关节肿胀度升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，各给药组小鼠关节直径无明显变化 ($P>0.05$)；随着给药时间延长，关节肿胀程度逐渐缓解，与模型组比较，补肾强督治痿汤中剂量组小鼠关节肿胀度降低 ($P<0.05$)。

3.3 补肾强督治痿汤对 AS 异位骨化小鼠趾跖关节肌腱端韧带骨化的影响

与正常组比较，HE 染

色显示模型组小鼠可见跗骨、跖骨及其韧带端部骨质增厚，番红固绿染色显示原附着于骨面及关节面的韧带组织，分化为呈红色的骨及软骨组织，且胶原纤维紊乱；与模型组比较，补肾强督治痿汤各剂量组和塞来昔布组小鼠新骨形成面积均减少，见图 3。与正常组比较，模型组小鼠可见跗骨、趾骨肌腱端部异位新骨形成，跗骨骨髓腔内侧可见骨质侵蚀，异位新骨体积增加 ($P<0.01$)；与模型组比较，



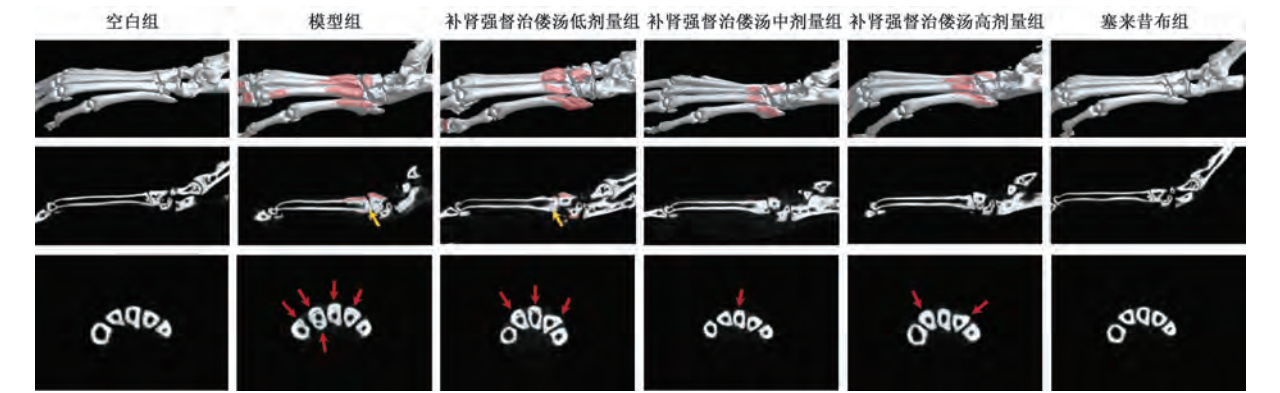
注：NB 表示新生骨组织；CB 表示原有皮质骨组织。红色虚线表示新生骨组织与原皮质骨分界线。标尺 200 μm 。

图 3 各组小鼠 HE 染色和番红固绿染色

Fig. 3 HE staining and safranin O-fast green staining of joints of mice in each group

补肾强督治痿汤各剂量组及塞来昔布组小鼠异位新骨体积减少 ($P<0.01$), 中、高剂量组及塞来昔布

组未见骨质破坏, 见图 4、表 3。



注: 红色区域、红色箭头表示异位骨形成, 黄色箭头表示骨质破坏。

图 4 各组小鼠足踝组织 micro-CT 结果

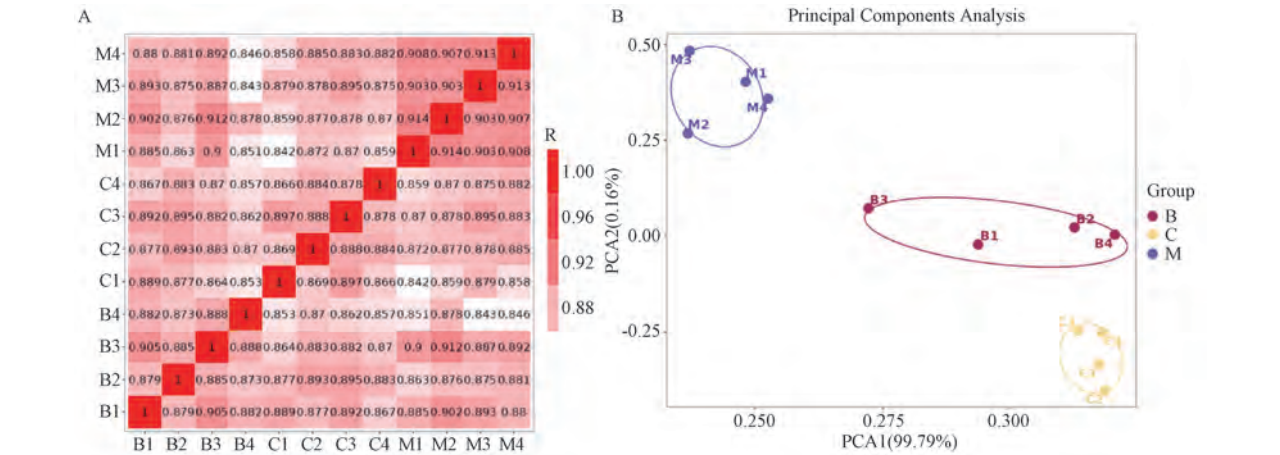
Fig. 4 Micro-CT results of ankle tissue of mice in each group

表 3 各组小鼠异位新骨体积比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Tab.3 Comparison of ectopic new bone volume of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	异位新骨体积/mm ³
空白组	0.00±0.00
模型组	2.82±0.30 ^{##}
补肾强督治痿汤低剂量组	1.78±0.33 ^{**}
补肾强督治痿汤中剂量组	1.36±0.65 ^{**}
补肾强督治痿汤高剂量组	1.03±0.52 ^{**}
塞来昔布组	0.79±0.66 ^{**}

注: 与空白组比较, ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P<0.01$ 。

3.4 各组小鼠足踝组织差异表达基因分析 PCA 分析和相关性分析显示, 3 组样品之间呈现分离趋势, 而组内样品表现出各自的聚集分布趋势, 见图 5。与空白组比较, 模型组小鼠关节组织差异基因共 4 794 个, 其中上调 4 481 个, 下调 313 个。与模型组比较, 补肾强督治痿汤高剂量组小鼠关节组织差异表达基因共 4 852 个, 其中上调 874 个, 下调 3 978 个, 见图 6~7。



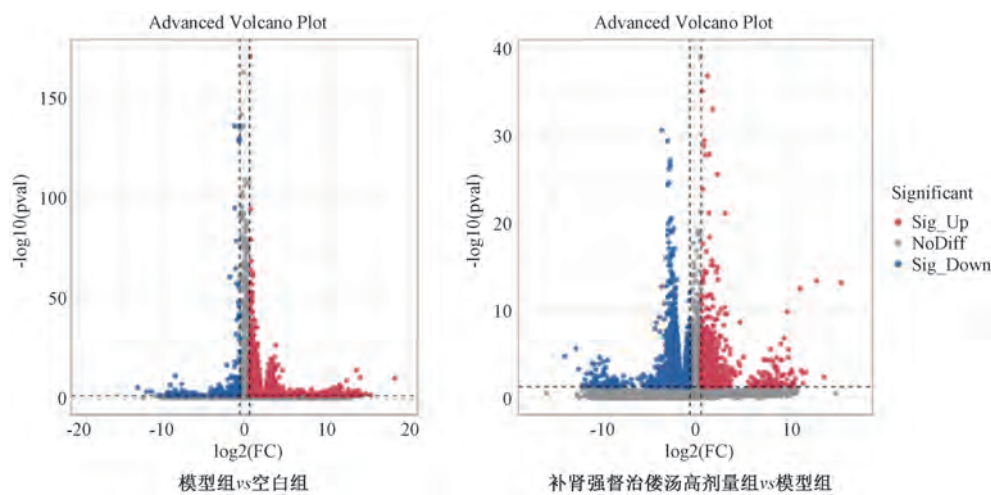
注: A 为相关系数分析图, B 为 PCA 主成分分析图。

图 5 各组小鼠关节组织样本重复性情况

Fig. 5 Reproducibility of joint tissue samples of mice in each group

3.5 各组小鼠足踝组织差异表达基因的富集分析 为进一步了解与补肾强督治痿汤治疗 AS 异位骨化相关的 DEGs 所涉及的功能类别或者细胞定位, 进行 GO 富集分析及 KEGG 通路富集分析。其中生物过程涉及 RNA 聚合酶转录调控、细胞周期、

蛋白磷酸化等; 细胞组成涉及细胞质、细胞核等中; 分子功能涉及蛋白质结合、金属离子结合、转录酶活性、核苷酸结合等, 见图 8。根据 P 值大小, 分别筛选出空白组与模型组, 模型组与补肾强督治痿汤高剂量组中显著富集前 20 条通路, 其中



注：每个点对应 1 个差异基因，红色表示表达量上调，蓝色表示表达量下调，灰色表示没有差异。

图 6 差异基因火山图
Fig. 6 Volcano plot of differentially expressed genes

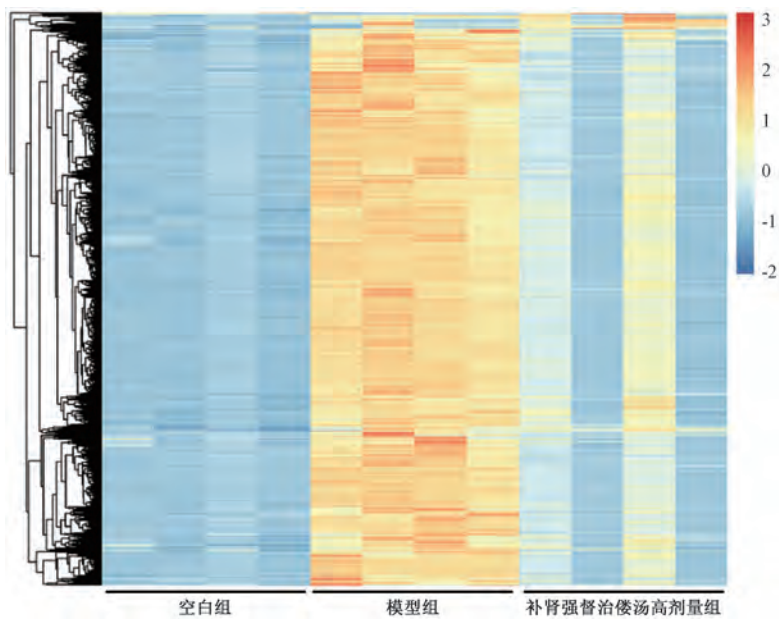


图 7 差异基因热图
Fig. 7 Heatmap of differentially expressed genes

涉及 HIF-1 信号通路、Hippo 信号通路等，见图 9。

3.6 补肾强督治痿汤对 Hlfcs 细胞活性的影响 如表 4 所示，培养 72 h 后，4、8 mg/mL 组细胞活性较 0 mg/mL 组降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，提示质量浓度大于 2 mg/mL 的补肾强督治痿汤会抑制 Hlfcs 细胞活性。因此，选择 0.25、0.5、1 mg/mL 质量浓度进行后续实验。

3.7 补肾强督治痿汤对 Hlfcs 细胞成骨分化标志染色影响 与空白组比较，模型组细胞外基质出现被茜素红染成橘红色的矿化结节，表明成纤维细胞成骨分化模型构建成功，见图 10。与空白组比

表 4 不同质量浓度补肾强督治痿汤对 Hlfcs 细胞活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab. 4 Effects of Bushen Qiangdu Zhilou Decoction at different mass concentrations on the viability of Hlfcs cells ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	细胞活性/%
补肾强督治痿汤 0 mg/mL	100.00±2.00
补肾强督治痿汤 0.0625 mg/mL	99.06±2.34
补肾强督治痿汤 0.125 mg/mL	107.61±2.61
补肾强督治痿汤 0.25 mg/mL	107.09±2.51
补肾强督治痿汤 0.5 mg/mL	102.99±3.62
补肾强督治痿汤 1 mg/mL	95.08±3.08
补肾强督治痿汤 2 mg/mL	84.09±3.03
补肾强督治痿汤 4 mg/mL	78.65±2.85*
补肾强督治痿汤 8 mg/mL	28.06±5.66**

注：与补肾强督治痿汤 0 mg/mL 组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

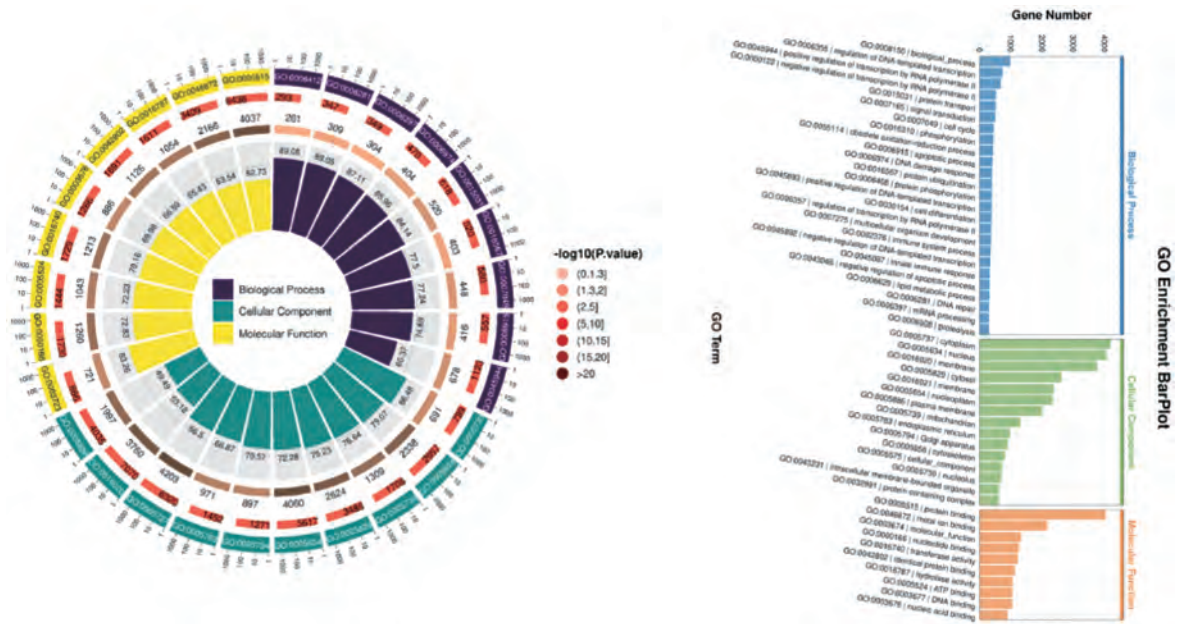


图 8 GO 富集圈图与柱状图

Fig. 8 GO enrichment circular plot and bar chart

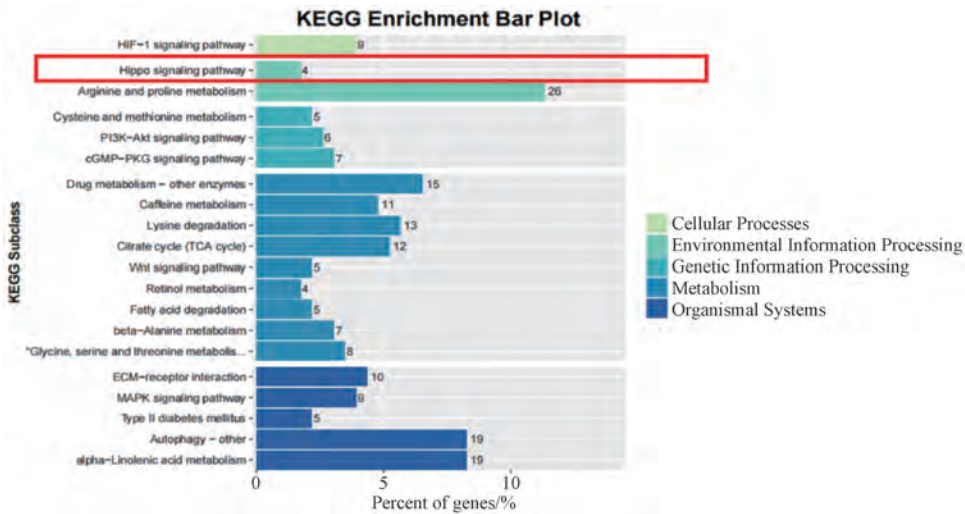


图 9 KEGG 富集柱状图

Fig. 9 KEGG enrichment bar chart

较，模型组 ALP 阳性染色程度增加，ALP 阳染细胞面积增加 ($P<0.01$)，矿化结节增加 ($P<0.01$)；与模型组比较，补肾强督治痿汤各剂量组 ALP 阳性染色面积减少 ($P<0.01$)，阳染矿化结节减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 11、表 5。

3.8 补肾强督治痿汤对 Hlfcs 细胞成骨分化标志性蛋白及基因表达的影响 与空白组比较，模型组 Col1a1、SOX9、OPN 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组比较，补肾强督治痿汤各剂量组 Col1a1、RUNX2 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，补肾强督治痿汤高剂量组 OPN、SOX9 蛋白表达降

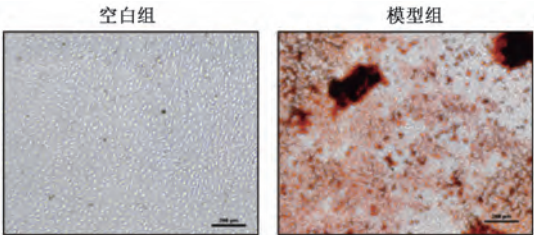


图 10 Hlfcs 成骨诱导后茜素红染色结果

Fig. 10 Alizarin red S staining results of Hlfcs after osteogenic induction

低 ($P<0.01$)，见图 12、表 6。与空白组比较，模型组 RUNX2 mRNA 表达升高 ($P<0.05$)；与模型

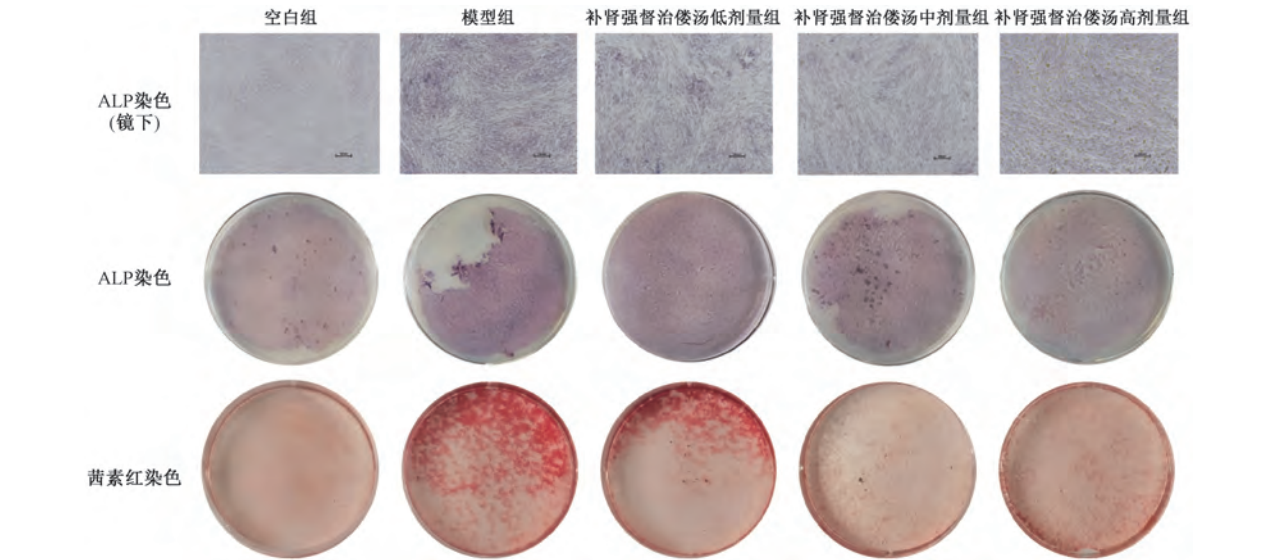


图 11 各组 Hlfcs 细胞 ALP、茜素红染色

Fig. 11 ALP and Alizarin red S staining of Hlfcs cells in each group

表 5 各组 Hlfcs 细胞 ALP 和茜素红染色面积比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	ALP 染色面积/%	茜素红染色面积/%
空白组	6.31±6.75	7.20±3.68
模型组	56.10±7.66 ^{##}	70.77±12.61 ^{##}
补肾强督治痿汤低剂量组	21.91±8.72 ^{**}	36.58±5.53 [*]
补肾强督治痿汤中剂量组	18.78±4.54 ^{**}	16.29±7.23 ^{**}
补肾强督治痿汤高剂量组	28.57±1.99 ^{**}	17.78±5.52 ^{**}

注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

组比较，补肾强督治痿汤低剂量组 ALP、RUNX2 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)，见表 7。

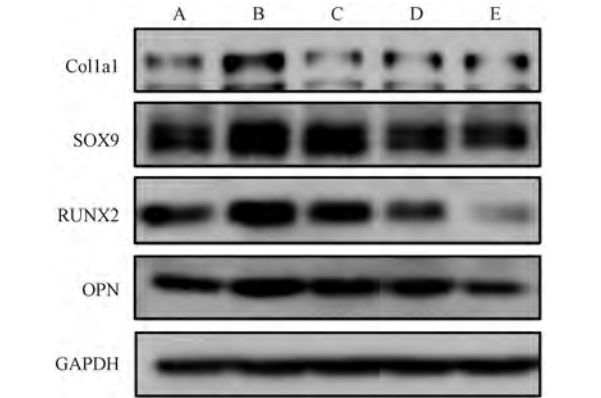
3.9 补肾强督治痿汤对 Hlfcs 细胞成骨分化模型 Hippo/YAP 通路相关蛋白表达及 YAP 核定位的影响 与空白组比较，模型组细胞 Hippo 通路关键蛋

表 6 各组 Hlfcs 细胞 Col1a1、SOX9、RUNX2、OPN 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	Col1a1	SOX9	RUNX2	OPN
空白组	19.54±11.19	45.68±15.40	42.70±12.22	49.92±16.72
模型组	67.87±6.74 ^{##}	75.32±9.14 [#]	61.00±11.80	88.33±9.87 [#]
补肾强督治痿汤低剂量组	18.60±2.93 ^{**}	63.57±7.05	34.66±9.23 [*]	80.66±8.77
补肾强督治痿汤中剂量组	24.96±8.15 ^{**}	44.15±17.36	35.82±4.71 [*]	71.51±11.12
补肾强督治痿汤高剂量组	37.84±6.56 ^{**}	40.46±5.42 ^{**}	29.74±10.84 [*]	36.88±9.75 ^{**}

注：与空白组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

白 LATS、YAP 蛋白磷酸化水平均降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，补肾强督治痿汤中、高剂量组 LATS、YAP 蛋白磷酸化水平均升高 ($P<0.05$)，低剂量组 YAP 蛋白磷酸化水平升高 ($P<0.05$)，见图



注：A 为空白组，B 为模型组，C~E 分别为补肾强督治痿汤低、中、高剂量组。

图 12 各组 Hlfcs 细胞 Col1a1、SOX9、RUNX2、OPN 蛋白条带图

Fig. 12 Protein bands of Col1a1, SOX9, RUNX2, and OPN of Hlfcs cells in each group

与空白组比较，模型组细胞内与 DAPI 共定位的核内 YAP 荧光强度增强 ($P<0.01$)；与模型组比较，补肾强督治痿汤各剂量组细胞内与 DAPI 共

表 7 各组 Hlfcs 细胞 ALP、Col1a1、RUNX2 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

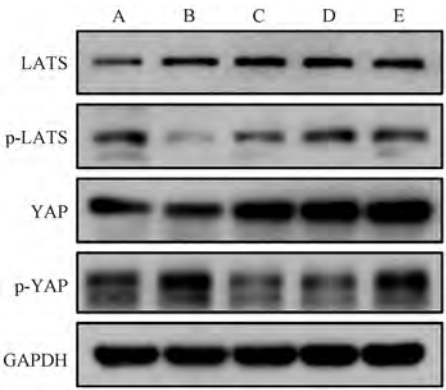
Tab. 7 Comparison of ALP, Col1a1, and RUNX2 mRNA expressions of Hlfcs cells in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	ALP	Col1a1	RUNX2
空白组	1.00±0.09	1.00±0.05	1.00±0.05
模型组	1.92±0.33	1.86±0.32	1.36±0.07 [#]
补肾强督治痿汤低剂量组	0.80±0.15 [*]	1.21±0.14	1.04±0.03 [*]
补肾强督治痿汤中剂量组	1.05±0.30	1.01±0.02	1.03±0.12
补肾强督治痿汤高剂量组	1.12±0.21	1.39±0.07	0.97±0.15

注：与空白组比较，[#] $P<0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ 。
定位的核内 YAP 荧光强度减弱 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 14、表 8。

4 讨论

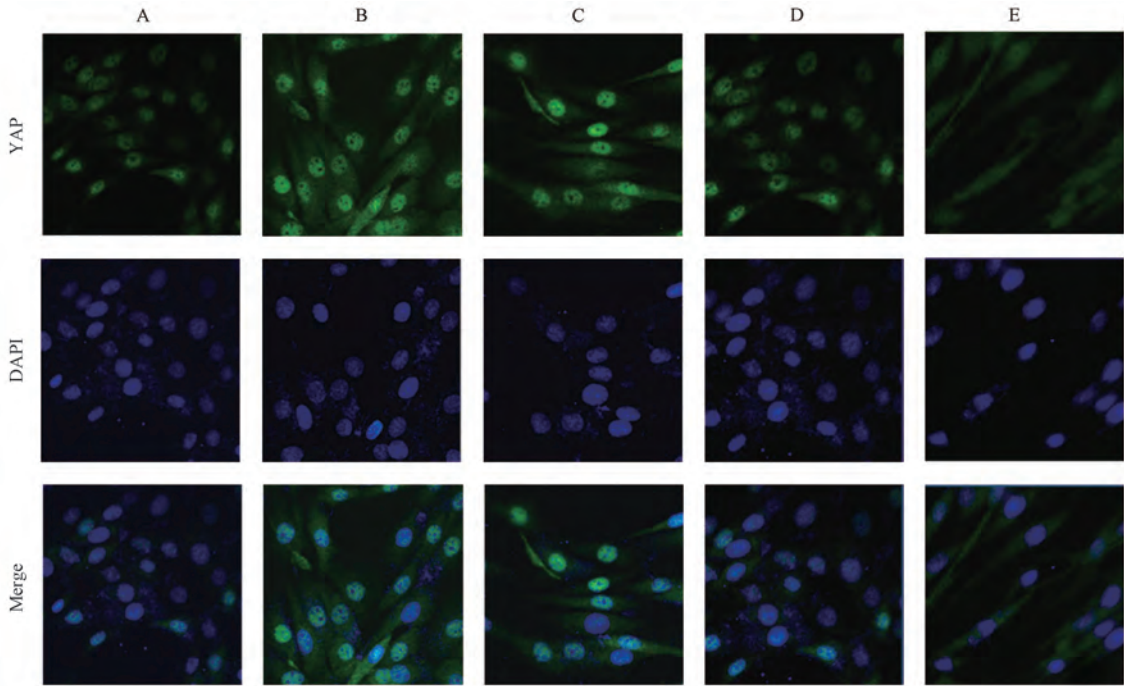
异位骨化是 AS 的主要病理特征，也是治疗 AS 的核心难点之一^[18]。焦树德教授认为，大傣比一



注：A 为空白组，B 为模型组，C~E 分别为补肾强督治痿汤低、中、高剂量组。

图 13 各组 Hlfcs 细胞 LATS、p-LATS、YAP、p-YAP 蛋白条带图

Fig. 13 Protein bands of LATS, p-LATS, YAP, and p-YAP of Hlfcs cells in each group



注：A 为空白组，B 为模型组，C~E 分别为补肾强督治痿汤低、中、高剂量组。

图 14 各组 Hlfcs 细胞 YAP 蛋白核定位情况

Fig. 14 Nuclear localization of YAP protein of Hlfcs cells in each group

表 8 各组 Hlfcs 细胞 LATS、YAP 磷酸化水平及核内 YAP 荧光强度比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 8 Comparison of LATS and YAP phosphorylation levels and nuclear YAP fluorescence intensity of Hlfcs cells in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	p-LATS/LATS	p-YAP/YAP	核内 YAP 荧光相对强度/%
空白组	1.56±0.38	1.23±0.62	17.96±6.84
模型组	0.39±0.24 [#]	0.44±0.07 [#]	70.14±6.87 ^{##}
补肾强督治痿汤低剂量组	0.66±0.56	1.36±0.50 [*]	52.78±5.94 [*]
补肾强督治痿汤中剂量组	0.88±0.15 [*]	1.47±0.59 [*]	30.30±8.18 ^{**}
补肾强督治痿汤高剂量组	1.05±0.24 [*]	1.16±0.63	21.31±3.97 ^{**}

注：与空白组比较，[#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

般的风、寒、湿痹更为复杂，病情更深重，寒湿之邪深侵入肾累及肝，而寒邪入侵肾督，阳气不得开阖，是形成大傺之因，为此专设的补肾强督治傺汤以补肾强督、祛寒活络、强壮筋骨为治则^[19]，在临床上屡获良效，具有缓解患者疾病活动度，改善病理性新骨形成的作用^[20]。

CAIA 小鼠因其在自身免疫炎症中产生的关节韧带端部的病理性骨化，近年来常被用于 AS 异位骨化的研究^[21]。本研究结果显示，补肾强督治傺汤缓解了 CAIA 小鼠的关节炎症，亦能显著抑制其关节韧带的病理性新骨形成，且未引起体质量及肝、脾、肾脏指数改变。

转录组测序分析发现，PI3K/Akt、HIF-1 α 、Hippo/YAP 等信号通路激活，这些通路的激活往往与炎症过程密切相关^[22]。HIF-1 α 转录因子是低氧反应及关节炎症中血管新生的重要媒介^[23]，而在关节炎症中，这些通路亦被看作是关节炎症的潜在治疗靶点之一^[24]。KEGG 通路富集分析发现，Hippo/YAP 通路参与补肾强督治傺汤治疗异位骨化过程。Hippo/YAP 通路与成骨、组织异常位置生长关系密切^[25-26]，参与骨组织细胞的成骨过程^[27]，与骨代谢有着密切联系^[28]。在 AS 病理性新骨形成过程中，韧带成纤维细胞的 Hippo/YAP 通路可被机械信号变化激活，促使其及其他成骨谱系细胞向成骨方向分化^[29]。

AS 患者韧带成纤维细胞较正常人往往具有更强的成骨倾向，是异位骨化的关键效应细胞之一^[30-31]。特定病理因素刺激下，此类细胞可异常增殖并向成骨细胞分化，分泌骨基质，导致骨赘形成及最终骨融合^[32-33]。本研究结果显示，补肾强督治傺汤可以减少成骨相关标志物基因及蛋白表达，减少韧带成纤维细胞的钙盐结节分泌，表明其可以抑制韧带成纤维细胞的成骨分化。

YAP 蛋白通过与核内特定转录因子相互作用来协调转录，促进成骨相关蛋白及转录因子的表达。Hippo 通路激活时，包括 LATS 在内的核心激酶磷酸化，使得 YAP 磷酸化，难以进入细胞核并发生降解。本研究结果显示，成骨诱导中 Hlfcs 细胞 LATS 磷酸化水平降低，Hippo 通路被抑制，细胞核内 YAP 表达增加；补肾强督治傺汤干预后，LATS、YAP 磷酸化水平均升高，核内 YAP 表达减少，表明补肾强督治傺汤可能通过 Hippo/YAP 通路干预韧带成纤维细胞成骨分化过程。

综上所述，补肾强督治傺汤可减轻 AS 异位骨

化小鼠韧带端部病理性新骨形成，其作用可能与激活韧带成纤维细胞 Hippo 信号通路，促进 YAP 磷酸化与降解，抑制韧带成纤维细胞成骨分化相关。这一发现为补肾强督治傺汤的临床应用提供了新的科学依据，也为中医药防治 AS 异位骨化提供更坚实的理论基础。

参考文献：

- [1] Navarro-Compán V, Sepriano A, El-Zorkany B, *et al.* Axial spondyloarthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80 (12): 1511-1521.
- [2] Ritchelin C, Adamopoulos I E. Axial spondyloarthritis: new advances in diagnosis and management[J]. *BMJ*, 2021, 372: m4447.
- [3] Claushuis T A M, de Vries M K, van der Weijden M A C, *et al.* C-reactive protein polymorphisms influence serum CRP-levels independent of disease activity in ankylosing spondylitis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2015, 33(2): 159-165.
- [4] Ramiro S, Nikiforou E, Sepriano A, *et al.* ASAS-EULAR recommendations for the management of axial spondyloarthritis: 2022 update[J]. *Ann Rheum Dis*, 2023, 82(1): 19-34.
- [5] Wang R, Dasgupta A, Ward M M. Predicting probability of response to tumor necrosis factor inhibitors for individual patients with ankylosing spondylitis[J]. *JAMA Netw Open*, 2022, 5(3): e222312.
- [6] Pelechas E, Kaltsonoudis E, Voulgari P V, *et al.* Unmet needs in the treatment of ankylosing spondylitis: a long-term observational study from a single university center[J]. *Rheumatol Int*, 2019, 39(4): 663-668.
- [7] 林昌松, 陈纪藩. 中医辨病辨证治疗强直性脊柱炎[J]. *新中医*, 2004, 36(5): 5-6.
- [8] 李满意, 娄玉铃. 强直性脊柱炎的中医源流[J]. *风湿病与关节炎*, 2017, 6(7): 60-65.
- [9] 易 浩, 李 可, 谭 希, 等. 补肾强督治傺方对强直性脊柱炎炎症及 IL-23/IL-17 的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(2): 1081-1087.
- [10] Ma M, Yang Z, Li K, *et al.* Molecular insights into the therapeutic mechanisms of Bushen-Qiangdu-Zhilv decoction for ankylosing spondylitis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 340: 119269.
- [11] Kovar H, Bierbaumer L, Radic-Sarikas B. The YAP/TAZ pathway in osteogenesis and bone sarcoma pathogenesis[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 972.
- [12] 张 晨, 宋国瑞, 刘子歌, 等. Hippo-YAP/TAZ 信号通路在骨性关节炎中的表达[J]. *宁夏医科大学学报*, 2021, 43(10): 1088-1091.
- [13] Li Z, Chen S, Cui H, *et al.* Tenascin-C-mediated suppression of extracellular matrix adhesion force promotes entheseal new bone formation through activation of Hippo signalling in ankylosing spondylitis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80(7): 891-902.

[14]

Chen S, Li Z, Chen D, *et al.* Piezo1-mediated mechanotransduction promotes enthesal pathological new bone formation in ankylosing spondylitis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2023, 82(4): 533-45.

[15]

常晓朋, 陈 涛, 赵 寅, 等. 骨形态发生蛋白 2 和转化生长因子 β 2 协同促进骨髓间充质干细胞成骨分化[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(1): 1-6.

[16]

付 姣, 刘宏潇. BMP 与强直性脊柱炎病理性成骨[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(5): 553-555; 559.

[17]

冯仲锴, 孙永强, 刘汝银, 等. microRNA-204 抑制强直性脊柱炎成纤维细胞成骨分化[J]. 临床与实验病理学杂志, 2015, 31(12): 1374-1378.

[18]

Zhu W, He X, Cheng K, *et al.* Ankylosing spondylitis: etiology, pathogenesis, and treatments[J]. *Bone Res*, 2019, 7: 22.

[19]

焦树德. 强直性脊柱炎的治疗经验[J]. 河北中医, 2004, 26(10): 725-726.

[20]

Zhou Y Y, Huang R Y, Lin J H, *et al.* Bushen-Qiangdu-Zhilv decoction inhibits osteogenic differentiation of rat fibroblasts by regulating connexin 43[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(1): 347-353.

[21]

Zhou Y Y, Lin J H, Huang R Y, *et al.* Treatment of ankylosing spondylitis with a Bushen-Qiangdu-Zhilv Decoction: a case report with a 3-year follow-up [J]. *Altern Ther Health Med*, 2016, 22 Suppl 1: 36-40.

[22]

Hao W, Chen S, Chao H, *et al.* IL-33-induced TREM2⁺ macrophages promote pathological new bone formation through CREG1-IGF2R axis in ankylosing spondylitis[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(18): e2500952.

[23]

Jia N, Gao Y, Li M, *et al.* Metabolic reprogramming of proinflammatory macrophages by target delivered roburic acid effectively ameliorates rheumatoid arthritis symptoms[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 280.

[24]

Han R, Zhou D, Ji N, *et al.* Folic acid-modified ginger-derived extracellular vesicles for targeted treatment of rheumatoid arthritis by remodeling immune microenvironment *via* the PI3K-AKT pathway[J]. *J Nanobiotechnology*, 2025, 23(1): 41.

[25]

Kowalczyk W, Romanelli L, Atkins M, *et al.* Hippo signaling instructs ectopic but not normal organ growth[J]. *Science*, 2022, 378(6621): eabg3679.

[26]

Li F, Negi V, Yang P, *et al.* TEAD1 regulates cell proliferation through a pocket-independent transcription repression mechanism[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(22): 12723-12738.

[27]

Pan J X, Xiong L, Zhao K, *et al.* YAP promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation by regulating β -catenin signaling[J]. *Bone Res*, 2018, 6: 18.

[28]

Bose S, Sarkar N, Vahabzadehs S. Sustained release of vitamin C from PCL coated TCP induces proliferation and differentiation of osteoblast cells and suppresses osteosarcoma cell growth[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 105: 110096.

[29]

张歆缘, 王 斌, 于 晖, 等. Hippo 信号通路在骨代谢中的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2019, 46(3): 263-269.

[30]

Kim C L, Choi S H, Mo J S. Role of the Hippo pathway in fibrosis and cancer[J]. *Cells*, 2019, 8(5): 468.

[31]

Yi K, Jo S, Song W, *et al.* Analysis of single-cell transcriptome and surface protein expression in ankylosing spondylitis identifies OX40-positive and glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-positive pathogenic Th17 cells[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2023, 75(7): 1176-1186.

[32]

Li D H, He C R, Liu F P, *et al.* Annexin A2, up-regulated by IL-6, promotes the ossification of ligament fibroblasts from ankylosing spondylitis patients[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 674-679.

[33]

Bleil J, Maier R, Hempfing A, *et al.* Granulation tissue eroding the subchondral bone also promotes new bone formation in ankylosing spondylitis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(10): 2456-2465.